

УДК 57.043, 57.044

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АЭРОЗОЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА И ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОМАТЕРИАЛА НА БАКТЕРИИ НА ПРИМЕРЕ УГЛЕРОДНОГО НАНОМАТЕРИАЛА «ТАУНИТ»

© А.А. Гусев, В.В. Родаев, И.А. Васюкова,
А.Г. Ткачев, О.В. Захарова, А.В. Зрютина

Ключевые слова: биотестирование; многостенные углеродные нанотрубки; аэрозольные наночастицы; нанотоксичность.

Представлены результаты показателей концентрации наночастиц в производственных помещениях объекта наноиндустрии (ОАО «Тамбовский завод «Комсомолец» им. Н.С. Артемова) в зоне производства углеродных наноматериалов) и непромышленной (бытовой) зоне (на территории НОЦ «Нанотехнологии и наноматериалы» ТГУ им. Г.Р. Державина). Приведены результаты воздействия углеродного наноструктурного материала «Таунит» на бактерии *E. coli*, *B. cereus* и *E. coli M-17*.

ВВЕДЕНИЕ

В последние несколько десятилетий все больше данных указывают на растущее загрязнение атмосферного воздуха, которое, в свою очередь, является причиной неблагоприятного воздействия на организм. Имеется большое количество научной литературы по данному вопросу, включая эпидемиологические, клинические и токсикологические исследования, а также исследования неблагоприятных последствий для здоровья, начиная от заболеваний респираторной системы и заканчивая смертельными исходами от сердечно-сосудистых заболеваний и рака легких. Во многих крупных городах ведется систематический мониторинг содержания вредных химических примесей в воздухе. Традиционными стали исследования загрязнения воздушного бассейна городов автомобильным транспортом [1].

В настоящее время стало проводиться все большее количество исследований, направленных на выявление токсического действия наночастиц различного происхождения. Это связано с такими особенностями, как химическая и каталитическая активность поверхности наночастиц, отсутствующая у этого же вещества, имеющего более крупную дисперсность. Особенностью наночастиц, проявляющейся в их токсичности, является их высокая концентрация в воздухе при незначительном количестве самого распыленного вещества и их способность к ингаляционному, трансдермальному, транснейральному и энтеральному проникновению в любые органы и ткани человека, включая ЦНС [2].

Наиболее доступным путем проникновения для наночастиц считается ингаляционный способ. При таком способе проникновения наночастицы преодолевают воздушные пути, транспортирующие воздух в легочную ткань (трахеобронхиальный и назофарингеальный регионы), и попадают в альвеолы, где происходит газообмен. Воздушные пути хорошо защищены от про-

никновения крупных частиц благодаря активному эпителию и вязкому слизистому слою на его поверхности. Однако в газообменной области альвеол барьер между альвеолярной стенкой и капиллярами очень тонкий и легко для них проникаем.

Сейчас доступны результаты целого ряда экспериментальных исследований, выполненных на мелких грызунах и посвященных изучению токсичности нанотрубок при их ингаляционном введении. Эти исследования показали, что пролонгированное введение *углеродных нанотрубок* (УНТ) может вызывать хроническое воспаление легких, формирование гранулем, фиброз и в некоторых случаях смерть [3–4].

По данным последних исследований Йельского университета (США), однослойные углеродные нанотрубки проявляют сильную антимикробную активность. Ученые получили новые доказательства того, что прямой контакт с УНТ может привести к серьезному повреждению клеточных мембран и вызвать гибель бактерий *E. coli* [5].

Российские ученые с использованием метода *атомно-силовой микроскопии* (АСМ) описали характер контакта углеродных наноматериалов с клетками *E. coli* и оценили последствия подобного взаимодействия. В ходе проведенных исследований установлено повреждение поверхностных структур и обусловленная этим гибель *E. coli* при их контакте с одностенными углеродными нанотрубками низкой степени очистки. Выявлено существенное усиление сродства C_{60} -фуллеренов, функционализированных аминными группами, к поверхности модельных микроорганизмов, также ведущего к гибели *E. coli* [6].

Другая группа ученых в своих исследованиях влияния *многостенных углеродных нанотрубок* (МУНТ) на выживаемость грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также на их культуральные и морфологические свойства установили, что МУНТ оказывают достоверное стимулирующее действие на рост и раз-

множение грамотрицательных бактерий (*E. coli* 113-13) по сравнению с грамположительными. Выявлено, что МУНТ вызывают диссоциацию свойств всех исследованных микроорганизмов [7–8].

Поэтому целью нашей работы стало исследование содержания аэрозольных наночастиц в воздухе рабочей зоны нанотехнологического производства и оценка воздействия этих наночастиц на распространенные в экотоксикологии тест-объекты (бактерии *E. coli*, *B. cereus*, *E. coli* M-17).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – углеродный наноматериал «Таунит» (УНМ «Таунит», многостенные углеродные нанотрубки), производимый в промышленных масштабах ООО «НаноТехЦентр» (г. Тамбов) на территории ОАО «Тамбовский завод «Комсомолец» им. Н.С. Артемова». Данный материал представляет собой одномерные, наномасштабные, нитевидные образования поликристаллического графита, цилиндрической формы с внутренним каналом, в виде сыпучего порошка черного цвета. Гидрофобен, химически инертен, чистота – более 98 %. Гранулы УНМ микрометрических размеров имеют структуру спутанных пучков многостенных трубок, способ получения – *газофазное химическое осаждение* на металлическом катализаторе (ГФХО) или CVD-процесс.

Эксперимент состоял из двух частей: исследование концентрации наночастиц в атмосферном воздухе и оценка токсичности наноматериала по выживаемости бактерий.

1. Исследование концентрации наночастиц в атмосферном воздухе.

Экспериментальные исследования по аппаратному анализу проб воздуха в производственных помещениях объекта наноиндустрии и непромышленной (бытовой) зоне проводились с помощью спектрометра-классификатора частиц с высокой мобильностью FMPS модель 3091 (производство США).

Спектрометр FMPS классифицирует гранулометрические составы на основании дифференциальной электрической классификации мобильности (как сканирующая система-классификатор мобильных частиц SMPS). Электрически заряженный аэрозоль поступает в колонку анализатора рядом с его центральной осью над центральным электродом. Частицы радиально отходят от него и собираются на электрически изолированных электродах, которые находятся у наружной стенки. Числовая концентрация частиц определяется измерением электрического тока, собранного на серии электродов. Размер анализируемых частиц варьирует от 5,6 до 560 нм, концентрация – от 10^3 до 10^9 шт./см³.

Измерения содержания наночастиц в атмосферном воздухе проводились последовательно в непромышленном помещении на территории НОЦ «Нанотехнологии и наноматериалы» ТГУ им. Г.Р. Державина (контроль) и цеху ОАО «Тамбовский завод «Комсомолец» им. Н.С. Артемова» в зоне производства углеродных наноматериалов (эксперимент).

Аэрозольный спектрометр FMPS модель 3091 размещался на полу. Расстояние от спектрометра до действующей установки по производству углеродных на-

номатериалов составляло 5 м. Период измерений составлял 10 мин.

2. Оценка токсичности наноматериала по выживаемости бактерий.

Методика оценки токсичности наноматериала по выживаемости E. coli.

Перед использованием в токсикологических экспериментах УНМ и сажу диспергировали в дистиллированной воде при помощи ультразвуковой обработки в течение 5 мин., мощность – 300 Вт, частота – 23,740 кГц. Дистиллированную воду для контрольных экспериментов обрабатывали аналогичным образом.

Исследование проводили с учетом требований методики [9]. В качестве контроля использовали культуру *E. coli*, взвешенную в дистиллированной воде в концентрации 1 ед. по Макфарланду, что примерно соответствует $3 \cdot 10^8$ КОЕ/см³. Смешивали 1,0 см³ взвеси $3 \cdot 10^8$ КОЕ/см³ и 1,0 см³ дистиллированной воды, получив концентрацию взвеси $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/см³. Из этой взвеси делали высев на питательный агар методом штриховой разводки, инкубировали при 37 °С 24 ч. Путем расчета по стандартной таблице вычисляли количество клеток *E. coli*. В эксперименте смешивали 1,0 см³ взвеси $3 \cdot 10^8$ КОЕ/см³ *E. coli* и 1,0 см³ коллоидного водного раствора наноматериала в концентрациях 10 г/л, 1 г/л, 100 мг/л, 10 мг/л и 1 мг/л в 5 пробирках в трехкратной повторности, сделали высев на питательный агар методом штриховой разводки из каждой пробирки, инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Количество клеток *E. coli* в каждой пробирке вычисляли путем расчета по стандартной таблице.

Методика оценки токсичности наноматериала по выживаемости B. cereus.

Опыты проводили с учетом требований методики [9]. В качестве контроля использовали культуру *B. cereus*, взвешенную в дистиллированной воде в концентрации 1 единица по Макфарланду, что примерно соответствует $3 \cdot 10^7$ КОЕ/см³. Смешивали 1,0 см³ взвеси $3 \cdot 10^7$ КОЕ/см³ и 1,0 см³ дистиллированной воды, получив концентрацию взвеси $5 \cdot 10^6$ КОЕ/см³. Из этой взвеси делали высев на питательный агар методом штриховой разводки, инкубировали при 37 °С 24 ч. Путем расчета по стандартной таблице вычисляли количество клеток *B. cereus*. В эксперименте смешивали 1,0 см³ взвеси $3 \cdot 10^8$ КОЕ/см³ *B. cereus* и 1,0 см³ коллоидного водного раствора наноматериала в концентрациях 10 г/л, 1 г/л, 100 мг/л, 10 мг/л и 1 мг/л в 5 пробирках в трехкратной повторности, сделали высев на питательный агар методом штриховой разводки из каждой пробирки, инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Количество клеток *B. cereus* в каждой пробирке вычисляли путем расчета по стандартной таблице.

Метод оценки токсичности наноматериала по интенсивности гашения биолюминесценции бактерий E. coli M-17

Биотестирование проводили согласно методике [10]. Острое токсическое действие исследуемой пробы на тест-систему «Эколом» определяли по гашению биолюминесценции бактерий за 30-минутный период экспозиции. Для разбавления использовали дистиллированную воду. Измерение интенсивности биолюминесценции, определение *эффективной токсической концентрации* (ЭЛК₅₀) и *безвредной концентрации*

Таблица 1

Критерии отнесения токсикантов к классам опасности [11]

Класс опасности	Кратность разведения водного раствора тестируемого материала, при котором вредное воздействие на тест-объекты отсутствует
I	>10000
II	от 10000 до 1001
III	от 1000 до 101
IV	<100
V	1

(ЭБК₂₀) осуществляли с помощью прибора «Биотокс-10». Класс опасности определялся по кратности разведения водной вытяжки, при которой не выявлено воздействие на тест-объекты в соответствии с установленными критериями (табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Исследование концентрации наночастиц в атмосферном воздухе.

Исследования по аппаратному анализу атмосферного воздуха в производственных помещениях объекта наноиндустрии – производства исследуемого наноматериала (эксперимент) и бытовой зоне (контроль) показали следующие результаты (рис. 1, 2).

В зоне производства углеродных наноматериалов концентрация частиц достигла $2,41 \cdot 10^4$ шт./см³. При этом медиана распределения составила 77,5 нм. Размеры зафиксированных прибором частиц находились в диапазоне от 10,8 до 339,8 нм.

В атмосфере непромышленного помещения концентрация наночастиц составила $8,80 \cdot 10^3$ шт./см³ при максимуме распределения в области 80 нм. Разброс размеров зафиксированных прибором частиц лежал в диапазоне от 14,3 до 339,8 нм.

Таким образом, установлено, что показатель концентрации наночастиц, зафиксированных в воздухе производственной зоны, превысил контрольное значение в 2,74 раза. Также в производственной зоне отмечено наличие фракции более мелких наночастиц по сравнению с контролем. Это подтверждает наличие угрозы экспозиции наночастицами персонала, занятого при их производстве.

2. Оценка степени токсичности исследуемого наноматериала для бактерий.

Было проведено биотестирование наноматериала с использованием распространенных в экотоксикологии тест-объектов – бактерий.

Для бактерий *E. coli* были получены следующие результаты (табл. 2).

В свою очередь, по отношению к бактериям *B. cereus* наноматериал проявил следующие свойства (табл. 3).

Результаты исследования интегральной токсичности наноматериала на тест-системе «Эколом» (*E. coli* M-17) представлены в табл. 4.

Таким образом, анализируя результаты экспериментов, поставленные на двух распространенных видах бактерий, можно отметить, что антибактериальные свойства наноматериала начинают проявлять уже в концентрации 1 мг/л, в дальнейшем этот эффект нелинейно меняется и достигает максимума при концентрации 1 г/л, или 0,1 %. Неравномерная динамика изменения токсических свойств не позволила определить оптимальные и безопасные концентрации наноматериала для указанных организмов.

Таким образом, установлено, что УНМ «Таунит» относится к умеренно опасным веществам. Это соответствует классу опасности природного углеродного наноструктурного материала – сажи [12]. Относительно низкая токсичность многостенных углеродных нанотрубок согласуется с результатами других исследований [13–14].

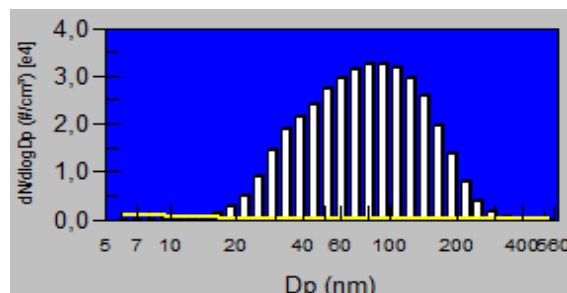


Рис. 1. Распределение наночастиц по размерам и концентрации (эксперимент)

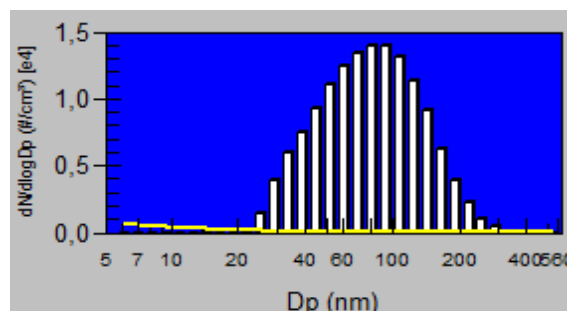


Рис. 2. Распределение наночастиц по размерам и концентрации (контроль)

Таблица 2

Воздействие наноматериала на тест-объект *E. coli*

Концентрация УНМ, г/л	0 (контроль)	10	1	0,1	0,01	0,001
Количество клеток <i>E. coli</i> в 1 см ³ раствора	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$

Таблица 3

Воздействие наноматериала на тест-объект *B. cereus*

Концентрация УНМ, г/л	0 (контроль)	10	1	0,1	0,01	0,001
Количество клеток <i>E. coli</i> в 1 см ³ раствора	5·10 ⁵	1·10 ⁵	5·10 ⁴	1·10 ⁵	5·10 ⁵	1·10 ⁵

Таблица 4

Воздействие УНМ на биосенсор «Эколюм» (0 – гибель организмов; 1 – организмы выжили)

Тест-объект	Концентрация коллоидного раствора наноматериала (г/л); в скобках указана кратность разведения раствора водой					Класс опасности
	100 (1x)	10 (10x)	1 (100x)	0,1 (1000x)	0,01 (10000x)	
Тест-система «Эколюм»	0	0	0	1	1	III

Механизмами токсического действия наноматериала могут служить повреждение мембран клеток, окислительный стресс [15] или механическое воздействие агломератов наноматериала.

Наибольший токсический эффект был отмечен для бактерий *E. coli* M-17 (полулетальная концентрация – 0,13 г/л), что с учетом результатов экспериментов с бактериями *E. coli* и *B. cereus* согласуется с данными о бактерицидной активности углеродных наноматериалов [13–16].

Следует отметить, что установленный в ходе экспериментов класс опасности наноматериала (табл. 5) лежит в диапазоне от «малоопасного» до «умеренно-опасного» [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате были сделаны следующие *выводы*.

1. Выявлено, что показатель концентрации наночастиц, зафиксированных в воздухе зоны производства исследуемого наноматериала, превысил контрольное значение в 2,74 раза. В производственной зоне отмечено наличие фракции более мелких наночастиц по сравнению с контролем. Это подтверждает наличие угрозы экспозиции углеродными наночастицами персонала, занятого при их производстве.

2. Бактерии *E. coli*, *B. cereus*, *E. coli* M-17 проявили высокую чувствительность в МУНТ. По существующей классификации материал может быть отнесен к умеренно-опасным веществам на уровне природного аналога (сажи).

3. Полулетальная концентрация углеродного наноматериала в водной среде для бактерий *E. coli* M-17 составляет 0,13 г/л. Для бактерий *E. coli*, *B. cereus* отмечен пик токсического действия (в 10–1000 раз по сравнению с контролем) при концентрации наноматериала 1 г/л, что дает основание говорить о бактерицидном эффекте. При этом на последних двух объектах отмечен нелинейный характер изменения токсичности наноматериала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буковский М. Е., Царева Н.П. Расчет количества загрязняющих веществ, выброшенных автотранспортом в центральной части города Тамбова // Современные проблемы контроля качества при-

родной и техногенной сред: материалы 3 Междунар. науч.-практ. конф. Тамбов: Издат. дом ТГУ им. Г.П. Державина, 2010. С. 28-29.

2. Снопотницкий М.В., Поклонский Д.Л., Паньгина С.А. Токсичность наночастиц // Актуальные проблемы биологической защиты войск и населения: материалы Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России – ЦВТИ БЗ». Екатеринбург, 2009. С. 41-44.
3. Warheit D.B, Laurence B.R, Reed K.L [et al.] Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats // Toxicol Sci. 2004. № 77. P. 117-125.
4. Carrero-Sanchez J.C, Elias A.L, Mancilla R. [et al.] Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen // Nano Lett. 2006. № 6. P. 1609-1616.
5. Carbon nanotubes render *E. coli* inactive. URL: <http://nanotechweb.org/cws/article/tech/30831>. Загл. с экрана.
6. Дерябин Д.Г., Васильченко А.С., Алешина Е.С., Тлягулова А.С., Никитин А.Н. Исследование взаимодействия углеродных наноматериалов с клетками *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. № 11–12. С. 103-108.
7. Кушнарченко А.Н., Нечаева О.В., Пермякова Н.Ф. Влияние углеродных наноструктур на биологические свойства бактерий. URL: <http://www.ystrp.ru/archive/ystrp-2008/2009-10-09-14-41-41/1225-2008-11-11-00-Nov-th%20>. Загл. с экрана.
8. Нечаева О.В., Пермякова Н.Ф., Кушнарченко А.Н., Торгашов Г.В., Тихомирова Е.И. Влияние многостенных углеродных нанотрубок на биологические свойства грамположительных и грамотрицательных бактерий. URL: <http://rusnanotech10.rusnanoforum.ru/Document.aspx/Download/30648>. Загл. с экрана.
9. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. 58 с.
10. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 16.1:2:3:3.8-04. М., 2004.
11. Об утверждении критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды: приказ МПР России от 15.06.2001 г. № 511. URL: <http://www.dioxin.ru/doc/prikaz511.htm>. Загл. с экрана.
12. ФККО. Федеральный классификационный каталог отходов. URL: <http://www.fkko.ru>. Загл. с экрана.
13. Kang S., Herzberg M., Rodrigues D.F., Elimelech M. Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter! // Langmuir. 2008. V. 24. № 13. P. 6409-6413.
14. Kang S., Mauter M.S., Elimelech M. Microbial Cytotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials: Implications for River Water and Wastewater Effluent // Environmental Science & Technology. 2009. V. 43. № 7. P. 2648-2653.
15. Vecitis Ch.D., Zodrow K.R., Kang S., Elimelech M. Electronic-Structure-Dependent Bacterial Cytotoxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes // ACS Nano. 2010. V. 4. № 9. P. 5471-5479.
16. Dong L., Henderson A., Field C. Antimicrobial Activity of Single-Walled Carbon Nanotubes Suspended in Different Surfactants // Journal of Nanotechnology. 2012. V. 2012. 7 pages doi:10.1155/2012/928924.

БЛАГОДАРНОСТИ: Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ.

Поступила в редакцию 14 октября 2012 г.

Gusev A.A., Rodaev V.V., Vasyukova I.A., Tkachev A.G., Zakharova O.V., Zrutina A.V. STUDY OF CONTENT OF AEROSOL NANOPARTICLES IN WORKING AREA OF NANOTECHNOLOGY MANUFACTURING AND EVALUATION

OF IMPACT OF NANOMATERIALS ON EXAMPLE OF BACTERIAL CARBON NANOMATERIAL "TAUNIT"

The results of performance concentration of nanoparticles in the premises of the object nanotechnology (public corporation "Tambov factory "Komsomolets" named after N.S. Artemov" in the area of production of carbon nanomaterials) and non-productive (domestic) zone (in the center "Nanotechnologies and Nanomaterials" TSU named after Derzhavin) are presented. The results of the impact of carbon nanostructured material "Taunit" the bacteria *E. coli*, *B. cereus* and *E. coli M-17* are given.

Key words: bio-test; multiwall carbon nanotubes; aerosol nanoparticles; nanotoxicity.